

⑨日本国特許庁
公開特許公報

⑩特許出願公開
昭52—134019

⑤Int. Cl.²
A 61 K 39/02
C 12 K 5/00

識別記号

⑥日本分類
30 D 1
36(2) B 3

庁内整理番号
7432—44
7235—49

④公開 昭和52年(1977)11月9日

発明の数 1
審査請求 有

(全 6 頁)

⑧鶏のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症
ワクチン

②特 願 昭51—50480

②出 願 昭51(1976)4月28日
(特許法第30条第1項適用 昭和51年4月9
日第81回日本獣医学会において発表)

⑦発 明 者 佐々本文存

宇治市広野町寺山28の4番地
⑦発 明 者 武光哲
京都府綴喜郡宇治田原町大字南
小字東道祖神29番地の1
⑦出 願 人 株式会社微生物化学研究所
宇治市槇島町24の16番地
⑦代 理 人 弁理士 鎌田嘉之

2

明 細 書

1 発明の名称

鶏のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症
ワクチン

2 特許請求の範囲

P P L O 培地中 3.1 ± 1 ℃ で増殖し、P P L O 培地に移植後 85 ~ 48 時間で培地を黄変し、 4.1 ± 1 ℃ で増殖しない性質と鶏の鼻腔内に接種した場合上部気道のみで増殖し、気管内に接種しても上下両気道に増殖しない性質を有するマイコプラズマ・ガリセプチカムの変異菌を有効成分とする鶏のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症ワクチン。

3 発明の詳細な説明

本発明は鶏のマイコプラズマ・ガリセプチカム *Mycoplasma gallisepticum* (以下 M G と記す。) 菌感染症ワクチンに関する。

M G 菌に感染した鶏は慢性気管炎を惹起して、しょうすいしその産卵率は低下し、その上他の病原体に感染し易くなり、又他の病原体の生ワクチ

ンを接種した場合混合感染によりその生ワクチンの副作用を誘発することは知られているが未だ鶏の M G 菌感染症ワクチンは知られていない。

本発明者は以上の事情に鑑み、前記のワクチンの製法を目的にして研究したところつぎの知見を得た。

- (1) 公知の M G 菌株を P P L O 培地中に 3.7 ± 1 ℃ で 2 ~ 5 日間培養し、 1.50 ± 1.0 代継代すると同培地に 3.1 ± 1 ℃ で増殖し径約 0.3 μ の大型集落を形成する菌株に変異する。
- (2) この変異菌株を更に前記の培地に 3.1 ± 1 ℃ で 40 ~ 50 時間間隔で 1.00 ± 1.0 代継代すると M G 菌感染症に対する免疫性を付与できる弱毒性変異菌株が得られる。
- (3) この弱毒性変異菌株は 4.0 ± 1 ℃ で増殖しない。
- (4) この弱毒性変異菌株を前記の培地に培養し増殖させて得た含菌培養液を基質にしてこれとグリシン、乳糖、ポリペプトンの pH 7.0 の緩衝水溶液からなる懸濁液を凍結乾燥することによ

り、有効期間の長い鶏のM.G.感染症ワクチンが得られる。

本発明は上記の知見に基づいてなされたものである。

本発明のワクチンはつぎの性質を有する。

(1) 試験管内における性質

- 1) 本発明のワクチンをP.P.L.O液体培地に移植し $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で40～50時間培養するとワクチン中のM.G.変異菌は径0.8μ前後の大型集落を形成して $(8 \sim 9) \times 10^7$ C.F.U./m.lに増殖する。(C.F.U.:集落形成単位)
- 2) 本発明のワクチンをP.P.L.O液体培地に移植し $31 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持すると35～48時間で培地を黄変する。
- 3) 本発明のワクチンを $41 \pm 1^\circ\text{C}$ でP.P.L.O培地に何時間保持してもそのワクチン中のM.G.変異菌は増殖しない。
- 4) 60°C で30分加熱するとこのワクチン中のM.G.変異菌は死滅する。

(2) 生体内における性質

公知のM.G.菌株(例えばK.P.13株、S.B.株)をP.P.L.O液体培地に $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で2～5日培養して得た菌株を 150 ± 10 代継代して $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で増殖する集落を分離し、この菌株を $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 、40～50時間間隔で継代し、その間1～5代目ごとに分別した大型集落を培養することを繰り返して計 250 ± 10 代の累代菌株を取得し、この菌株をP.P.L.O液体培地に $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で40～50時間培養して得た含菌培養液をグリシン、乳糖、ポリペプトン及び精製水からなる滅菌液(A保蔵剤)と混合してなる液を常法により凍結乾燥して製品とする。

前記のA保蔵剤の代りにしよ糖、グルタミン酸ナトリウム、卵白アルブミン、第一リン酸カリ、第二リン酸カリを含有する滅菌水溶液からなるB保蔵剤を使用してもよいが、この場合得られるワクチンの含菌量はA保蔵剤を使用した製品の含菌量の約70%である。

本発明のワクチンは2～5℃の冷蔵所に貯蔵すれば12～18か月間有効である。

- 1) M.G.菌抗体を有しないヒナ、中ヒナ及び成鶏に本発明のワクチンを経気道(点鼻)又は飲水投与法で接種すると、M.G.変異菌株が上部気道(鼻腔)内のみが増殖し、下部気道(気管、肺、気嚢)内には増殖しない。
 - 2) 前記の各鶏の気管内及び気嚢内に本発明のワクチンを接種してもM.G.変異菌はどの呼吸気道からも検出されない。
 - 3) 前記の各鶏に本発明のワクチンを接種しその2週後にM.G.菌強毒株の $10,000$ 感染量を気嚢内に接種しても供試鶏には気嚢内炎症が発現しない。
 - 4) M.G.菌の侵入が認められる鶏にNDウイルスB1株又はIB滋養株を接種するとその鶏に気嚢内炎が発現するが、前記の鶏に本発明のワクチンを接種し、その2週後にNDウイルスB1株又はIBウイルス滋養株を接種してもその鶏は気嚢内炎を発現しない。
- 本発明のワクチンはつぎの如くにして製造することができる。

実施例1

- (1) M.G.菌K-18株の 250 ± 10 累代菌株の作出

公知のM.G.菌K.p-13株を後記処方のP.P.L.O液体培地に $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で2～5日間培養して 5×10^6 C.F.U./m.lの菌増殖能を有する菌株を得、この菌株を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 150 ± 10 代継代して $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で24時の培養で培地を黄変する機能と 5×10^7 C.F.U./m.lの菌増殖能を併有する菌株を得る。この菌株を後記の処方のP.P.L.O平板培地に塗抹し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で前記と同様に培養し、形成した径0.8μ前後の大型集落から釣菌しこれをP.P.L.O液体培地に移植し $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で45±5時間間隔で継代し、その間1～5代ごとに大型集落を分離して前記と同様に培養することを繰り返して、 250 ± 10 代累代菌株(250 ± 10 菌増)を得る。

この菌株はつぎの性質を有する。

A) 試験管内における性質

- 1) P.P.L.O液体培地中 $31 \pm 1^\circ\text{C}$ 、48時間

培養した菌株の菌増殖能は $(6 \sim 9) \times 10^7$ OFU/μl であるが P P L O 以外の培地では生育しない。

2) $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で P P L O 液体培地に培養すると 35 ~ 48 時間で培地を黄変する。

3) P P L O 培地で $41 \pm 1^\circ\text{C}$ の培養条件では菌は増殖しない。

4) 生体内における性質

1) ヒナ、中ヒナ及び成鶏に本菌株を点鼻投与又は飲水投与すると、この菌株は鼻腔内にのみ増殖し、他の器管内では増殖しない。

2) S P F 30 日齢のヒナにこの菌株を接種すると接種後 2 週より 7 週までのものに平均 10 倍前後の抗体価が認められる。

3) この菌株の接種 2 週間後の S P F 鶏に M G 菌毒株を接種しても鶏は発病しない。

4) この菌株の接種 2 週間後の S P F 鶏に N D ウイルス B I 株又は I B ウイルス滋養株を接種してもその鶏には気管炎が発現しない。

5) この菌株は 80°C で 30 分保持すると死滅

第 1 表

	(1)	(2)
牛の心臓浸出液の乾 燥粉末	10.0	10.0
ペプトン	1.0	1.0
塩化ナトリウム	0.5	0.5
ブドウ糖	0.1	0.1
酢酸ナトリウム	0.025	0.025
寒 天	—	1.5
蒸 留 水	80.0	80.0

(単位：重量部)

(2) ワクチン基質の製造

1) 0.250 ± 0.10 菌株の乾燥

0.250 ± 0.10 菌株 0.2 ml (1.2×10^7 OFU) を P P L O 液体培地 40 ml に移植し $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で 48 時間培養して得た増殖培養液と後記の保液剤 40 ml とを混和し、その 1 ml を内容 5 ml の滅菌バイアル 80 本に分注し、常法で凍結乾燥し減圧下で封栓して 0.250 ± 0.10 菌株の乾燥品を得、これを $2 \sim 5^\circ\text{C}$ の

特開 昭52-134019 (3)

する。

前記の P P L O 液体培地及び同平板培地の処方はつぎの通りである。

a) P P L O 液体培地の処方

後記第 1 表 (1) の組成物を 120°C で 30 分間加熱滅菌し、常温にまで放冷後この液にペニシリン G カリウムを目的の液体培地 1 ml 当りにペニシリン G カリウムが 1000 単位含むように添加しついで無菌馬血清を加えて全量 100 容量部とする。

b) P P L O 平板培地の処方

後記第 1 表 (2) の組成物を 120°C で 30 分間加熱滅菌後 40°C 前後に保持しこれに無菌馬血清 20 容量部を混合しこれをシャーレに分注し室温になるまで放冷する。

冷暗所に保存する。

前記保液剤はグリシン 3% (W/V)、乳糖 8% (W/V) 及びポリペプトン 2% (W/V) を含有する精製水溶液を 120°C で 20 分間加熱滅菌したものである。

2) ワクチン基質の製造

内容 500 ml の培養フラスコ 5 個に P P L O 液体培地 400 ml 宛をいれ 120°C で 30 分間加熱し、常温にまで放冷後この液の 5 ml 宛を 1) の乾燥 0.250 ± 0.10 菌株在中のバイアルに分注して乾燥菌株を溶解し、その 2 ml を採取しこれを前記の加熱処理した P P L O 液体培地 400 ml に移植し $31 \pm 1^\circ\text{C}$ で 40 ~ 50 時間培養してワクチン基質を得る。その 1 ml 中の菌数を稀釈法で測定したところ 6×10^7 OFU であった。

(3) 乾燥ワクチンの製造

前記の保液剤 50 ml にワクチン基質 50 ml を加えホモジナイザーで処理してワクチン基質の懸濁液となし、その 2 ml を内容 20 ml の

滅菌済のバイアル50本に分注し、これを常法により凍結乾燥し減圧下に密栓して乾燥ワクチン製品0.14~0.15gを得た。

前記製品に20mlのpH7.0のリン酸緩衝滅菌液を注入して乾燥ワクチンを溶解した液(以下この液を稀釈ワクチンという。)中の菌数の測定値は 8×10^6 CFU/mlであった。(乾燥ワクチン中の菌数は 4×10^8 CFU/gである。)

試験例1

- (1) 使用ワクチン：稀釈ワクチン(1×10^6 CFU/ml)
- (2) 供試鶏及びその数：80日のSPF鶏150羽(50羽宛3群に区分する。)
- (3) 接種方法
I区：供試鶏50羽に稀釈ワクチン 2×10^6 CFU/羽を点鼻投与する。
II区：供試鶏50羽に稀釈ワクチンを 4×10^6 CFU/羽を飲水投与する。
III区：対照群(ワクチン非接種群)50羽

- (3) 攻撃菌を分離した羽数/検査羽数

試験例2

- (1) 使用ワクチン：稀釈ワクチン
- (2) 供試鶏及びその数：40日齢のSPF鶏150羽
- (3) 接種方法
I区：50羽 稀釈ワクチン 8×10^5 CFU/羽を点鼻投与する。
II区：50羽に稀釈ワクチン 1.5×10^6 CFU/羽を飲水投与する。
III区：対照群(ワクチン非接種群)50羽
- (4) 効果の測定方法
1) ワクチン接種後2、5、7、13、15週に採血しそれぞれの血清凝集価(抗体価)を測定する。
2) ワクチン接種後1)と同時期にMG強毒菌KP-13株の培養液0.1ml(6×10^6 CFU)を後胸気の内側に接種し14日後に殺処分し気管のう病変発現の有無を剖検する。
(5) 各試験成績は第3表の通りであった。

(4) 効果の測定方法

- 1) 各試験区の鶏にワクチン接種後14日目に採血し、その血清凝集価(抗体価)を測定する。
- 2) 各試験区の鶏にワクチン接種後14日目にMG強毒菌KP-13株のPPLD液体培地に培養した液0.1ml(6×10^6 CFU)を後胸気の内側に接種し14日後に気管のう病変発現状況及び鼻腔、気管、気管のうにおける攻撃菌の分布状況をしらべた。
- (5) 試験成績は第2表の通りであった。

第2表

試験区	抗体価 ¹⁾	気管のう炎の発生 ²⁾	菌の分離 ³⁾		
			鼻 腔	気 管	気管のう
I	26	0/10	0/10	0/10	0/10
II	80	0/10	0/10	0/10	0/10
III	120	10/10	10/10	10/10	8/10

注

- 1) 血清凝集価の幾何学的平均値(GM)
- 2) 気管のう炎発生羽数/検査羽数

第3表

試験区	ワクチン接種後の抗体価 ¹⁾					攻撃後の気管のう炎の発生状況 ²⁾				
	2週	5週	7週	13週	15週	2週	5週	7週	13週	15週
I	1.3	1.0	7.5	2.5	2.5	0/10	0/10	0/10	0/10	8/10
II	1.1	1.0	5	2.5	2.5	0/10	0/10	0/10	0/10	10/10
III	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

注 1) 各区10羽のGM
2) 気管のう炎発生羽数/検査羽数

試験例3

- (1) 使用ワクチン： 稀釈ワクチン
 (2) 試験場所： 京都府下R養鶏場
 (3) 供試鶏の品種： 白色レグホーン、産卵鶏
 (4) 試験方法： 20日齢のヒナ2000羽を2群に分け、I群(1000羽)に対し稀釈ワクチンをつぎの通り3回接種するがII群には接種しない。

第1回接種： 20日齢のヒナに稀釈ワクチンを 5×10^5 CFU/羽を点鼻投与する。

第2回及び第3回接種： 第1回接種80日目(100日齢)、ついで更に100日目(200日齢)にそれぞれ 1×10^6 CFU/羽を飲水投与する。

2) 観察方法

第I群について第1回接種前(20日齢)及び8週目(41日齢)、第2回接種時(100日齢)及び更に7週目(149日齢)、第3回接種時(200日齢)及び更に7週目(249日齢)にそれぞれ採血し、その血清凝集価を測定する

17

注 (1) 20羽のGM

3) 産卵率を第6表に示した。

第6表

試験区	日 齢	150	180	200
I	(%)	89.0	80.3	78.6
II	(%)	37.0	75.4	75.4

試験例4

- (1) 使用ワクチン： 稀釈ワクチン
 (2) 試験場所： 京都府F養鶏場
 (3) 供試鶏種： 白色レグホーン、産卵鶏
 (4) 試験方法
 1) ワクチンの接種

20日齢のヒナ2000羽を1000羽宛の2群に区分し、I群にはワクチンをつぎの通り3回接種するがII群には接種しない。

第1回接種： 20日齢にワクチン 8.3×10^5 CFU/羽を点鼻投与する。

第2回及び第3回接種： 第1回接種後80日

と共に育成率、体重の推移及び産卵率を観察した。

(5) 試験成績

1) 血清凝集価(抗体価)の推移を第4表に示した。(20羽のGM)

第4表

試験区	20日 齢	41	100	149	200	249
I	2.5	11.2	7.8	12.8	2.5	11.6
II	2.5	2.5	42.8	63.5	53.2	45.2

備考： 両群には50日齢前後にMG菌の侵入が認められた。

2) 育成率及び体重の推移を第5表に示した。

第5表

試験区	200日 齢までの育成率(%)	体 重 (g)				
		20日 齢	41	100	149	200
I	93.0	180	420	1580	2000	2110
II	90.8	128	395	1490	1980	2000

18

目(100日齢)及び120日目(200日齢)にそれぞれワクチンを 1.7×10^6 CFU/羽飲水投与する。

2) 観察方法

I群の第1回ワクチン接種前(20日齢)、同接種後3週目(41日齢)、第2回接種時(100日齢)、及び第3回接種時(200日齢)にそれぞれ採血し、血清凝集価を測定すると共に育成率、体重の推移及び産卵率を観察した。

(5) 試験成績

I及びIIの両群の臨床症状と血清凝集価の推移をそれぞれ第7表に示し、200日齢までの育成率、体重の推移及び産卵率をそれぞれ第8表に示した。

第8表から明かな通りII群(ワクチン非接種の対照群)はI群に比し育成率が低いこと、育成が不良であること及び産卵率が著しく低いことが認められる。

これは第7表の成績から130日齢前後に感染性気管炎ウイルス及びMG菌の侵入を受けたこ

第 8 表

測定項目 試験群	育成率 (200 日齢) (%)	体 電 (V)				産卵率 %	
		20 日齢	41 日齢	100 日齢	149 日齢	200 日齢	200 日齢
I	91.4	129	415	1520	2100	2200	48 823 80.1
0	72.5	131	430	1480	1600	1830	13 68.4 70.5

とに起因するものと認められる。

第 7 表

試 験 群	臨床症状所見 (1)			140日からの 病原体の分離 2)		抗 体 価 3) (倍)			
	180 日齢	150 日齢	200 日齢	MO 陽	鶏伝染 性気管 支炎ウ イルス	20 日 齢	41 日 齢	100 日 齢	200 日 齢
	I	-	-	-	+	2.5	1.1	8.1	2.5
II	+	+	-	+	+	2.5	2.5	2.5	125

注 1) Ⅱ、+は呼吸器障害
2) +病原体の分離陽性
3) 血清凝集価